

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : B01J 13/20, C12Q 1/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/14544 (43) Date de publication internationale: 3 septembre 1992 (03.09.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00171 (22) Date de dépôt international: 25 février 1992 (25.02.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/02220 25 février 1991 (25.02.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CHAM- PAGNE MOET & CHANDON [FR/FR]; 20, avenue de Champagne, F-51205 Epernay (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : RINN, Jean-Charles [FR/FR]; 50 bis, rue A.-Briand, F-77124 Villenoy (FR). ROBILLARD, Bertrand [FR/FR]; 4, rue J.-S.-Bach, F- 51200 Epernay (FR). (74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc. ; Cabinet Beau de Lo- ménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), RU, SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: IONOTROPIC GEL LACKING A GELLING IONIC ENTITY, PROCESS FOR THE PREPARATION OF SUCH A GEL AND USE THEREOF ESPECIALLY IN A PROCESS FOR PRODUCING A SPARKLING WINE (54) Titre: GEL IONOTROPE DEFICIENT EN ENTITE IONIQUE DE GELIFICATION, PROCEDE DE PREPARA- TION D'UN TEL GEL ET UTILISATION DE CELUI-CI NOTAMMENT DANS UN PROCEDE D'ELABORA- TION DE VIN EFFERVESCENT (57) Abstract Ionotropic gel forming, in particular, a fermentation biocatalyst. The gel, chiefly in the form of spheres, is prepared from an ionic gel-forming material by means of an ionic gelling entity and is characterized in that said gel lacks a gelling ionic entity, thereby exhibiting an affinity for ions, especially cations, such as the calcium ion and potassium ion. According to an advanta- geous embodiment, the gel contains yeast cells or cells of fermentative micro-organisms. The invention is advantageous in a pro- cess for gelling wine froth, especially champagne, in order to avoid crystalline precipitation and diminish turbidity in the spar- kling wines obtained. It is also advantageous in processes for the removal of heavy metals, enzymatic or detection processes and fixing or purifying organic materials such as proteins or amino acids. (57) Abrégé L'invention concerne un gel ionotrope formant notamment biocatalyseur de fermentation. Ce gel, en particulier sous forme de billes, est préparé à partir d'un matériau ioniquement gélifiable au moyen d'une entité ionique de gélification, et caractérisé en ce que ledit gel est déficient en entité ionique de gélification, présentant ainsi une affinité pour les ions, en particulier les cations, tels que l'ion calcium, l'ion potassium. Selon une réalisation avantageuse, ce gel contient des cellules de levures ou de micro-orga- nismes de fermentation. L'invention est avantageuse dans le cadre du procédé de prise de mousse du vin, en particulier du vin de champagne, pour éviter les précipitations cristallines et diminuer la turbidité des vins effervescents obtenus, ainsi que dans le ca- dre des procédés d'élimination des métaux lourds, des procédés enzymatiques ou de reconnaissance, fixation ou purification de matériaux organiques, comme des protéines ou des acides aminés.		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MI	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brazil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

1

Gel ionotrope déficient en entité ionique de gélification, procédé de préparation d'un tel gel et utilisation de celui-ci notamment dans un procédé d'élaboration de vin effervescent.

05 La présente invention concerne essentiellement un gel ionotrope déficient en entité ionique de gélification, un procédé de préparation d'un tel gel et une utilisation de celui-ci notamment dans un procédé d'élaboration de vin effervescent tel que le champagne.

10 On sait qu'une catégorie de gels sont formés grâce à la fixation d'ions en certains sites précis de chaînes macromoléculaires, que l'on appelle sites de fixation ou sites de réticulation, formant ainsi des pontages entre ces chaînes. Ces ions, que l'on peut désigner sous l'expression générale "entité ionique de
15 gélification" sont, par exemple, des cations polyvalents, généralement bi- ou trivalents, tels que l'ion calcium ou l'ion aluminium. Les gels ainsi formés sont parfois appelés "gels ionotropes". Parmi ces gels, on peut citer les alginates, les pectates, les carragénanes, la carboxyméthylcellulose et les chitosanes. Une description
20 de ces gels a été faite en particulier par J. Klein et al. dans Angew. Makromol. Chem. (1979), vol. 76/77, n° 1141, p. 329-50 ; par K.D. Vorlop et al. dans Biotechnol. Lett. (1981), vol. 3, n° 1, p. 9-14 ; par H.J. Purz et al. dans Acta Polymerica (1985), vol. 36, n° 10, p. 569-574 et par R. Berger et al. dans Acta
25 Biotechnol. (1988), vol. 8, n° 5, p. 401-405.

L'acide alginique et l'acide pectique, par exemple, sont constitués de chaînes polysaccharidiques et sont largement répandus dans le règne végétal.

30 Leur utilisation industrielle est bien connue, en particulier dans l'industrie alimentaire, en particulier pour réaliser des biotransformations.

Dans le cas de l'acide alginique, par exemple, les cations polyvalents, tels que l'ion calcium Ca^{2+} , forment des pontages en certains sites précis des chaînes polysaccharidiques, correspondant à des séquences polyguluroniques, réalisant ainsi une
35 structure en mailles. Ce type de structure réticulée est mis à

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

2

profit, par exemple, dans l'immobilisation de micro-organismes, tels que bactéries ou levures, ou de macromolécules, telles que des enzymes.

Ainsi, pour certains procédés de fermentation utilisés dans les industries alimentaires par exemple, on a découvert l'intérêt d'utiliser des micro-organismes ou des enzymes, non plus à l'état libre, mais à l'état immobilisé dans des matériaux d'inclusion appropriés. Ces matériaux, grâce à leur structure en forme de réseau, retiennent les micro-organismes ou les enzymes, mais restent perméables aux substrats et aux produits de fermentation. Parmi les principaux avantages de cette technique, citons le fait qu'elle permet de travailler plus facilement en continu et qu'il est plus aisé de séparer les systèmes enzymatiques du milieu réactionnel (voir FR-A-2 320 349 INRA, le matériau d'inclusion étant une matrice de polyacrylamide ; FR-A-2 432 045 INRA, le matériau d'inclusion étant un polyacrylamide ou un alginat (revendication 4) ; l'Article dans la revue Pour la Science n° 146, décembre 1989, pages 20 à 21).

Selon l'une des techniques d'immobilisation de levures, celles-ci sont mises en suspension dans une solution aqueuse d'alginat de sodium. A partir de ladite suspension, on forme par exemple au moyen de buses de faible section des gouttelettes, que l'on fait ensuite tomber dans une solution de chlorure de calcium pour provoquer la formation d'un gel par réticulation ionique de l'alginat, sous forme de sphères gélifiées d'environ 2 à 3 mm de diamètre, communément appelées "billes". Ces billes sont ensuite rincées pour éliminer le chlorure de calcium en excès avant d'être utilisées telles quelles dans un procédé de fermentation, ou d'être conservées, soit dans un milieu aqueux approprié, soit, après séchage, pour une conservation de longue durée (FR 2 633 937).

De ce fait, les billes ainsi préparées, qui constituent des biocatalyseurs de fermentation, comportent une teneur importante en ions calcium, constituant principalement l'entité ionique de réticulation. D'une manière générale, on appelle "biocatalyseur" un système susceptible de réaliser une réaction biochimique, à partir d'un substrat, dans des conditions appropriées.

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

3

Par ailleurs, un problème très fréquent notamment dans les industries alimentaires, par exemple dans la préparation du boissons telles que les jus de fruit, le vin et le champagne, est celui de la précipitation sous forme de cristaux de certains composés tels que le bitartrate de potassium ou le tartrate de calcium. On a pu observer, par exemple dans le vin, que la solubilité de ces cristaux est largement dépendante du pH, du degré alcoolique, de la force ionique, de la température, mais aussi de la sursaturation du vin en ions calcium et surtout en ions potassium.

05 Les risques de précipitation de tartrate de calcium apparaissent lorsque la concentration en ion calcium est supérieure à environ 80 mg/l. Or, dans certains vins, comme le champagne, cette concentration est comprise entre 60 et 110 mg/l environ. De plus, ce phénomène de cristallisation est particulièrement important dans

10 certains processus oenologiques, tels que l'élaboration du champagne. En effet, lors de la seconde fermentation en bouteille, le degré alcoolique augmente, et des précipités apparaissent qui ne peuvent être éliminés par la suite, de façon relativement aléatoire, qu'à l'aide du remuage puis du dégorgement.

15 On comprend que la présence de dépôts cristallins est hautement préjudiciable à la qualité, notamment visuelle, des produits tels que le vin et surtout le champagne.

Dans le cas particulier du champagne, la présence de tels cristaux risque, en outre, de provoquer le phénomène dit de gerbage, c'est-à-dire l'expulsion brutale du liquide hors de la

25 bouteille au moment de son ouverture.

Egalement, dans le cas de l'élaboration du champagne par la technique des levures immobilisées dans des billes de gel d'alginate de calcium, des cristaux de tartrate de calcium peuvent

30 s'adsorber en surface des billes et les souder entre elles, formant ainsi une "plaque" de billes, ce qui pose un problème pour faire sortir ensuite ces plaques de la bouteille.

Enfin, la formation de ces cristaux est d'autant plus gênante et pernicieuse qu'elle se produit surtout dans le cas de la

35

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

4

précipitation de tartrate de calcium, de façon lente et retardée, parfois même après que le produit ait été conditionné pour la vente.

05 Dans l'élaboration du champagne, ce phénomène de cristallisation a tendance à s'aggraver en raison de l'utilisation de billes de biocatalyseur contenant du calcium, comme c'est le cas des billes constituées d'alginate de calcium.

10 En effet, l'apport supplémentaire d'ions calcium dans le milieu a tendance à intensifier la précipitation de tartrate de calcium, car une partie non négligeable des ions calcium présents dans ces billes est libérée progressivement dans le vin sous l'action de phénomènes physico-chimiques.

15 Comme il a été dit plus haut, ce problème technique des dépôts cristallins n'est pas limité à la production de vin ou de champagne, mais il existe également de manière générale dans de nombreux procédés industriels faisant intervenir des liquides. On peut citer le cas de l'industrie des jus de fruits, notamment des jus de raisin, où l'on peut observer des dépôts de tartrates.

20 Une augmentation des précipitations tartriques est également observée à la suite du traitement de désacidification du vin, consistant à relever le pH par addition de carbonate de calcium.

25 On a tenté de remédier à ce phénomène de dépôts cristallins par exemple en induisant la précipitation de ces cristaux par divers moyens, tel qu'un passage au froid (S. FERENCZI et al., Bulletin de l'O.I.V. 1982, n° 613, p. 202), l'adjonction de germes ; ou bien en différant cette précipitation, par exemple par adjonction d'acide métatartrique (J. FARKAS et al., Kvasny Prum. 1982, vol. 28, n° 8, p. 176-182 ; G. PARONETTO, Vignevini 1978, vol. 5, n° 6-7, p. 23-28).

30 Mais ces procédés ne sont pas réellement satisfaisants. En particulier, aucun ne règle le problème de la précipitation du tartrate de calcium. Par exemple, l'acide métatartrique est relativement instable. Il s'hydrolyse dans le temps et libère de l'acide tartrique. Son adjonction dans les vins aurait donc tendance dans
35 le temps à aggraver le problème que l'on cherche à résoudre.

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

5

De plus, la concentration en cations calcium libres, dans certains milieux tels que le vin, augmente avec le temps. On sait en effet que certains ions, comme l'ion calcium, sont protégés par des substances polymériques (telles que des colloïdes) et ne seront libérés qu'à plus ou moins longue échéance.

On pourrait également envisager d'utiliser des résines synthétiques échangeuses de cations pour éliminer les cations en excès, mais cette méthode est prohibée en oenologie par la législation de nombreux pays, en particulier en France. De plus, en raison de la non-sélectivité de cette technique vis-à-vis de nombreux cations, une quantité importante de composants responsables de la qualité gustative risquerait d'être éliminée.

Ainsi, le problème technique de la précipitation de dépôts cristallins dans les boissons, notamment les boissons fermentées telles que le vin ou le champagne, n'a pu être résolu jusqu'à présent d'une manière satisfaisante.

La présente invention a donc pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant d'éliminer, au moins en partie, les ions indésirables dans un milieu liquide donné.

Plus particulièrement, la présente invention a pour but de résoudre ledit problème technique en fournissant une solution permettant d'éliminer, au moins en partie, les ions responsables de la formation de dépôts cristallins dans les boissons, notamment les boissons fermentées, telles que la bière, le vin et le champagne.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de réduire l'apport d'ions responsables de précipitations de cristaux dans la mise en oeuvre de procédés ayant recours à l'emploi de biocatalyseurs constitués d'un matériau gélifié ionotrope, tel que l'alginate de calcium.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'un matériau, formant notamment un biocatalyseur de fermentation, qui soit utilisable non seulement pour supprimer les risques de préci-

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

6

05 pitations de dépôts cristallins, mais pouvant servir également dans les procédés enzymatiques ayant une activité enzymatique adaptée, notamment par la présence d'anions activateurs enzymatiques, ainsi que dans les procédés de reconnaissance ou de purification de matières organiques, comme par exemple dans le cas de la clarification de la bière pour éliminer les formations colloïdales.

La présente invention permet de résoudre pour la première fois les problèmes techniques énoncés précédemment, d'une manière satisfaisante, utilisable à l'échelle industrielle.

10 Car, il a été découvert, de façon tout à fait surprenante, que si on traitait les gels ionotropes, en particulier l'alginate de calcium, pour faire diminuer le taux de l'entité ionique de gélification, ces gels conservaient leur intégrité apparente, en particulier leur structure et leurs propriétés mécaniques, et pouvaient être utilisés dans diverses applications
15 industrielles, notamment comme biocatalyseur de fermentation, sous forme de billes par exemple.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne un gel ionotrope solide, en particulier sous forme de
20 billes, ou fixé sur un support approprié tel que grille ou filament, formé à partir d'un matériau gélifiable au moyen d'une entité ionique de gélification, caractérisé en ce que ledit gel est déficient en ladite entité ionique de gélification et présente des sites de fixation ionique résultant de l'absence de ladite entité
25 ionique, lui conférant ainsi une affinité pour les ions capables de se fixer dans ledit gel sur lesdits sites de fixation inoccupés par l'entité ionique de gélification.

De préférence, la teneur en entité ionique de gélification dans le gel selon l'invention est inférieure à 0,75 fois, de
30 préférence inférieure à 0,5 fois, et de préférence encore comprise entre 0,005 fois et 0,05 fois la teneur maximale correspondant à la saturation dans ledit gel des sites de fixation de l'entité ionique de gélification.

Selon une variante de réalisation de l'invention, le
35 matériau gélifiable précité est susceptible de s'écouler, et peut

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

7

être avantageusement utilisé sous forme de gouttes que l'on gélifie en les mettant en contact avec une solution aqueuse contenant l'entité ionique de gélification précitée.

05 Selon une variante de réalisation particulière de l'invention, le matériau gélifiable précité est choisi parmi le groupe constitué par : les sels hydrosolubles de l'acide alginique et de l'acide pectique, notamment les sels de métal alcalin, tel que sodium ou potassium, ou le sel d'ammonium, un carragénane, notamment sous forme iota et kappa, le chitosane et la carboxy-
10 méthylcellulose.

Selon une variante de réalisation particulièrement avantageuse de l'invention, le matériau gélifiable précité est un matériau gélifiable par l'ion calcium. L'entité ionique de gélification étant ainsi constituée par l'ion calcium, ce qui permet
15 d'obtenir, selon l'invention, un gel ionotrope appauvri en ions calcium, avide de cations.

Suivant une variante préférée, le gel selon l'invention est constitué par de l'alginate de calcium dont la teneur en ion calcium est inférieure à 1,5 mg/g de gel humide, de préférence
20 inférieure à 1 mg/g, et de préférence encore elle est comprise entre 0,01 mg/g et 0,1 mg/g de gel humide.

Selon une autre variante de réalisation avantageuse de l'invention, le matériau gélifiable précité constitue un matériau d'inclusion de micro-organismes, notamment de micro-organismes de
25 fermentation tels que les levures, ou de macromolécules telles que des enzymes, pour l'obtention d'un biocatalyseur gélifié déficient en entité ionique de réticulation, avide d'ions, en particulier d'ions calcium.

De préférence encore, ledit matériau d'inclusion ioniquement gélifiable est un matériau approprié compatible avec un milieu
30 de fermentation, en particulier du domaine de l'oenologie, de préférence constitué par du vin, pour la production de vins effervescents, et notamment de champagne. Dans cette application au vin, en particulier au vin effervescent, notamment le champagne, il est
35 préféré que la teneur en entité ionique de gélification soit infé-

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

8

rieure ou égale à environ 0,30 fois la teneur maximale correspondant à la saturation.

Avantageusement, ledit matériau d'inclusion est choisi parmi le groupe constitué par les sels alcalins ou d'ammonium de l'acide alginique ou pectique, de préférence l'alginate de sodium ou de potassium.

La présente invention, selon un deuxième aspect, concerne un procédé de préparation d'un gel solide ionotrope déficient en entité ionique de gélification, comprenant la gélification d'un matériau ioniquement gélifiable comportant des sites de fixation - ou sites de réticulation - sur lesquels se fixe ladite entité ionique de gélification, en produisant ainsi dans le gel ainsi formé la saturation des sites de fixation de ladite entité ionique, caractérisé en ce qu'après gélification par ladite entité ionique de gélification, on amène la teneur en entité ionique de gélification à un niveau inférieur à celui de ladite saturation.

Avantageusement, selon une caractéristique préférée du mode de réalisation du procédé selon l'invention, on amène la teneur en entité ionique de gélification à un niveau inférieur à 0,75 fois et de préférence inférieur à 0,5 fois celui de la teneur maximale correspondant à la saturation précitée, et de préférence encore il est compris entre 0,005 fois et 0,05 fois celui de ladite teneur maximale.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé selon l'invention, on réalise la diminution de la teneur en entité ionique précitée du gel formé par gélification dudit matériau ioniquement gélifiable, par échange ionique, en particulier avec des protons, par exemple au moyen d'une solution aqueuse d'un acide que l'on met en contact avec le gel précité pour que se produise un échange ionique entre ladite entité ionique et le proton.

De préférence, le pH de ladite solution aqueuse acide est compris entre 1 et 3,5, et de préférence encore il est compris entre 2,5 et 3,2.

La nature de l'acide choisi n'est pas vraiment critique. En particulier, on pourra utiliser de l'acide chlorhydrique à une

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

9

concentration correspondant à un pH convenable. Dans certains cas, en particulier lorsque le gel selon l'invention doit être utilisé dans un processus de fermentation par exemple en oenologie, on choisira de préférence un acide acceptable en alimentation tel que l'acide lactique. Toutefois, on choisira avantageusement un acide capable de former un complexe avec l'entité ionique de gélification, ce qui permet d'accélérer la réduction de la teneur en entité ionique de gélification du gel traité. Par exemple, en particulier lorsque l'entité ionique de gélification est l'ion calcium, on utilisera un diacide organique, dont les deux fonctions acides occupent de préférence les positions 1 et 4, tel que l'acide tartrique.

Les caractéristiques particulières décrites plus haut relativement au gel selon l'invention concernent également le présent procédé de préparation. En particulier, le matériau gélifiable est avantageusement susceptible de s'écouler en forme de gouttes que l'on transforme en billes gélifiées par action d'une solution aqueuse contenant l'entité ionique de gélification.

Selon une variante de réalisation particulière du procédé de préparation du gel selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce qu'on utilise comme matériau ioniquement gélifiable, un matériau compatible avec un milieu de fermentation, en particulier du domaine de l'oenologie, de préférence constitué par du vin, pour la production de vins effervescents, et notamment de champagne.

Un matériau ioniquement gélifiable préféré est constitué par un alginate alcalin, tel que l'alginate de sodium ou de potassium, ou l'alginate d'ammonium, l'entité ionique de réticulation étant constituée par l'ion calcium.

Suivant un mode de mise en oeuvre particulier du procédé de l'invention, le matériau ioniquement gélifiable constitue un matériau d'inclusion de micro-organismes, notamment de micro-organismes de fermentation tels que des levures, ou de macromolécules telles que des enzymes, pour l'obtention d'un biocatalyseur gélifié déficient en entité ionique de réticulation, avide d'ions, en particulier d'ions calcium.

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

10

La quantité de cellules de levure, tel que *Saccharomyces cerevisiae*, incluse dans le gel est du même ordre de grandeur que dans le cas d'immobilisation de cellules de levure dans des gels connus, par exemple cette quantité est comprise entre 100 millions et 600 millions de cellules de levure par millilitre de gel. Eventuellement, on peut aussi utiliser un gel à structure double couche comprenant un noyau dans lequel les cellules de micro-organismes sont incluses et une couche externe exempte desdites cellules.

Suivant une variante de réalisation pour laquelle la teneur en entité ionique de gélification doit être relativement faiblement abaissée, comme par exemple à moins d'environ 0,30 fois la teneur maximale à saturation, comme dans l'application en oenologie, l'abaissement peut être réalisé à une température voisine de la température ambiante, par exemple environ 20°C.

Suivant une variante du mode de réalisation précité particulièrement intéressante lorsque la teneur en entité ionique doit être très faible, l'abaissement de la teneur en entité ionique de gélification est effectué à une température comprise entre 4°C et 10°C, de préférence à environ 4°C.

Suivant une autre variante préférée du mode de réalisation précitée, lors de l'opération d'abaissement de la teneur en entité ionique de gélification, on réalise un apport en substrat nutritif dans le milieu contenant le gel ou biocatalyseur, en quantité juste nécessaire pour assurer la viabilité des micro-organismes, tels que les levures, inclus dans ledit gel ou biocatalyseur. Par exemple, dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, la quantité de substrat apportée dans ce milieu sera d'environ 0,4 mg de saccharose par heure pour $300 \cdot 10^6$ cellules.

Selon une caractéristique avantageuse du mode précité de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on maintient le pH de la solution acide précitée à une valeur d'au moins 2,7, lorsque le gel contient des cellules de micro-organismes, tels que des levures, afin de préserver l'activité desdites cellules.

Selon encore une autre variante de réalisation du procédé selon l'invention, après l'étape d'appauvrissement en entité ionique de gélification, on peut réaliser un nouvel échange ionique

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

11

pour introduire un ion métallique en vue d'un emploi particulier, tel que l'activation enzymatique, ou la reconnaissance, la fixation ou purification d'un matériau organique comme des protéines ou des acides aminés. Ces ions métalliques sont de préférence choisis
05 parmi le groupe consistant de magnésium, manganèse, zinc, potassium, fer, cuivre, calcium, cobalt, molybdène.

On observera que l'invention est particulièrement intéressante dans ces utilisations, car l'appauvrissement initial en entité ionique de gélification permet d'obtenir un milieu
10 réactionnel propre et de régler, de manière très précise, la proportion d'addition de l'un ou l'autre des ions métalliques précédemment cités, d'une manière extrêmement reproductible et fiable. Il est ainsi possible de régler l'activité enzymatique car de nombreuses enzymes ont besoin de la présence d'un ion métallique
15 pour leur activité et grâce à l'invention, cet ion métallique est présent en une quantité très précise, et stable grâce à l'inclusion dans le gel selon l'invention, puisque l'ion métallique participe à la structure chimique de ce gel.

La présence de cet ion métallique, en quantité très
20 précise et fiable, permet également de fixer ou purifier des matériaux organiques, en particulier des protéines ou des acides aminés, car ces protéines ou ces acides aminés ont des sites ou des groupes se fixant préférentiellement sur des ions métalliques. On peut citer par exemple la reconnaissance d'histidine par l'ion
25 cuivrique ou l'ion zinc.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne l'utilisation du gel selon l'invention, tel que précédemment défini, comme matériau destiné au piégeage d'ions, en particulier de cations.

30 Suivant un mode particulier de réalisation, on utilise le gel selon l'invention, en particulier sous forme de billes, dans l'industrie alimentaire, notamment dans l'industrie des jus de fruits et en oenologie, pour prévenir ou diminuer les risques de précipitation de cristaux, tels que le bitartrate de potassium et
35 le tartrate de calcium.

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

12

Selon une variante particulière du mode de réalisation précité, on utilise un gel ionotrope, tel que l'alginate de calcium, déficient en entité ionique de gélification, tel que précédemment défini, de préférence sous forme de billes, dans un procédé de "prise de mousse", en particulier en bouteille selon la méthode dite "méthode champenoise", consistant en la deuxième fermentation d'un vin, tel qu'un vin de champagne, après adjonction de sucre pour l'obtention d'un vin effervescent. Avantageusement, le gel précité contient des levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces bayanus*. La concentration en levures est de préférence comprise entre 10^8 et 6.10^8 cellules de levure par millilitre de gel.

La quantité de gel selon l'invention contenant des levures, de préférence sous forme de billes, introduite par bouteille de 75 cl pour le procédé de "prise de mousse" est généralement d'environ 4 ml pour une concentration d'environ 3.10^8 cellules de levure par millilitre de gel.

Est comprise également dans le champ de la présente invention l'utilisation dans le procédé de "prise de mousse" précité, de billes "classiques" de gel d'alginate de calcium, c'est-à-dire non déficientes en ions calcium, incluant des levures, auxquelles on a joint des billes de gel selon l'invention n'incorporant pas de levure, ces dernières ayant pour seule fonction de piéger les cations indésirables, tels que les ions potassium et les ions calcium.

On remarquera toutefois que l'expérience a montré que l'utilisation dans le procédé de "prise de mousse" de billes de gel d'alginate de calcium déficient en calcium, selon l'invention, incluant des levures, présentait un avantage important inattendu sur le plan de la turbidité du vin effervescent obtenu. En effet, cette turbidité est bien plus faible dans le cas de l'utilisation des billes selon l'invention que dans celui des billes classiques non déficientes en ion calcium. Avec les billes selon l'invention, et en particulier celles ayant une teneur en calcium inférieure ou égale à environ 0,30 fois la teneur maximale à saturation, non seulement on évite les précipitations tartriques, mais

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

13

également, l'évasion de levures hors des billes dans le vin est très fortement réduite voire inexistante. Cet avantage peut rendre inutile l'emploi, comme biocatalyseur, d'un gel à structure double couche tel que défini précédemment.

05 On observera, par ailleurs, que pour la mise en oeuvre "de la prise de mousse" du vin de champagne au moyen des billes selon l'invention, il suffit généralement que la teneur en calcium de ces billes soit abaissée à un taux d'environ 0,60 g/kg de billes humides, ce qui correspond à une teneur en calcium d'environ
10 0,30 fois la teneur maximale dans le gel, pour éviter tout risque de précipitation ultérieure de tartrate de calcium dans le vin.

 Suivant un autre mode de réalisation de l'invention, on utilise le gel selon l'invention, en particulier sous forme de billes, ou fixé sur un support approprié, tel que grille ou fila-
15 ment, dans des procédés d'élimination de métaux lourds, tels que le plomb, le baryum, le cobalt, le fer, le manganèse et le cuivre. Avantageusement, le gel selon l'invention peut être utilisé, par exemple en remplissage de colonnes, pour le traitement en continu des eaux, notamment celui des effluents urbains ou industriels.

20 Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne l'utilisation du gel selon l'invention, tel que précédemment défini dans un procédé enzymatique, en permettant ainsi de régler l'activité enzymatique, ledit gel comprenant alors une teneur déterminée en ion activateur enzymatique. Un tel ion activateur enzymatique
25 est en particulier choisi parmi le groupe consistant de magnésium, de manganèse, de zinc, de potassium, de fer, de cuivre, de calcium, de cobalt, de molybdène.

 Enfin, selon un cinquième aspect, la présente invention concerne encore l'utilisation du gel selon l'invention, tel que
30 précédemment défini dans un procédé de fixation ou de purification de matériaux organiques, en particulier de protéines ou d'acides aminés, ou encore un procédé de reconnaissance de tels protéines ou acides aminés. Dans ce cadre, le gel de l'invention contient alors une quantité prédéterminée d'ions métalliques de fixation, choisis
35 parmi le groupe précédemment énoncé, permettant la fixation du

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

14

matériau organique, en particulier des protéines ou des acides aminés.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de l'invention donnés simplement titre à d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

Exemple 1

Préparation du gel selon l'invention déficient en entité ionique de gélification

On prépare de manière connue un gel sous la forme de billes à partir d'une solution d'alginate de sodium à 1,2% en poids obtenue en mélangeant 120 g d'alginate de sodium dans 10 l d'eau distillée.

On produit des gouttelettes en faisant s'écouler la solution d'alginate goutte à goutte, à l'aide d'un appareil classique de formation de gouttes pouvant comporter un tube vertical de diamètre intérieur de 0,5 mm environ, dans un bain de gélification qui consiste en une solution aqueuse de chlorure de calcium à environ 16% en poids. Lorsqu'une goutte tombe dans le bain de réticulation, il se forme une bille de gel d'environ 3 mm, l'ion calcium constituant une entité ionique de gélification de l'alginate de sodium, ce dernier constituant un matériau ioniquement gélifiable par échange des ions Na^+ par les ions Ca^{2+} , cette technique étant bien connue à l'homme de l'art.

Ces billes ainsi formées, sont agitées doucement dans la solution de CaCl_2 pendant un temps approprié pour compléter la réticulation. Ensuite, les billes sont tamisées et lavées plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée.

Après quatre rinçages, la concentration en calcium dans ces billes brutes de réticulation est de l'ordre de 2 g/kg de billes humides.

Selon l'invention, on appauvrit ces billes en entité ionique de gélification, ici en calcium de la manière suivante :

Dans une cuve de 50 l équipée d'une agitation mécanique, on introduit 10 l de billes de gel préparées précédemment, et on

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

15

fait passer en continu une solution aqueuse d'acide tartrique à pH compris entre 2,5 et 3,2, de préférence à 2,7, soit une concentration pondérale d'environ 0,05 % en acide tartrique, par exemple au moyen d'une arrivée par la partie inférieure de la cuve et une
05 sortie par trop-plein supérieur. On règle le volume de solution acide à environ deux fois celui des billes, soit ici à 20 l environ. Le débit de la solution acide dans la cuve est réglée à environ 100 l/h, sa température peut être la température ambiante, c'est-à-dire comprise entre 18°C et 25°C.

10 Pendant le passage de cette solution, on maintient une agitation douce de manière à ne pas endommager les billes de gel.

D'après l'analyse des prélèvements effectués, on observe que la teneur en calcium des billes, qui était d'environ 2 g/kg avant traitement, chute assez rapidement pour atteindre environ
15 1 g/kg au bout de 2 h 30 et environ 0,4 g/kg au bout de 5 h.

Si l'on poursuit plus longtemps ce traitement dans les mêmes conditions, la diminution de la concentration en calcium dans les billes est plus lente : 0,3 g/kg à la 10e h, 0,1 g/kg à la 18e h et 0,05 g/kg environ au bout de 24 h.

20 On observe en outre qu'au cours de l'échange d'ions précité, le diamètre des billes décroît sensiblement. Cette diminution est d'environ 25 % au bout de 24 h, pour des billes mesurant environ 3 mm avant traitement.

On remarque enfin, et cela de façon inattendue, que la
25 structure du gel formant ces billes, en dehors de l'effet de contraction observé, ne semble pas avoir été modifié par le procédé décrit. En particulier, leurs propriétés mécaniques sont conservées, ce qui les rend aptes, en particulier à des utilisations industrielles, telles que celles précédemment décrites.

30

Exemple 2

Préparation d'un gel selon l'invention, constituant un biocatalyseur de fermentation

On prépare dans une première étape, des billes de gel d'alginate, comme à l'exemple 1, par gélification de gouttes de
35 solution aqueuse d'alginate de sodium en présence d'une solution aqueuse de chlorure de calcium. Toutefois, dans le cas présent, les

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

16

billes préparées ont une structure dite "double couche", c'est-à-dire formée d'un noyau constitué de gel d'alginate de calcium incluant des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae*, entourée d'une couche du même gel, mais sensiblement exempt de cellules de levure. Pour cela, on utilise un dispositif, tel que celui décrit dans le document DE-3 432 923 figure 5, constitué essentiellement de deux buses coaxiales verticales, disposées de façon que l'extrémité de la buse centrale soit légèrement plus basse que celle de la buse périphérique, et dont les dimensions sont telles qu'elles permettent l'écoulement goutte à goutte simultané de deux solutions aqueuses, l'une par la buse centrale, l'autre par la buse périphérique, la deuxième solution formant un film autour de la première. La solution arrivant par la buse centrale est une solution aqueuse d'alginate de sodium à 1,2 % en poids contenant $3 \cdot 10^{11}$ cellules par litre environ, celle arrivant par la buse périphérique est une solution aqueuse d'alginate de sodium de même concentration, mais ne contenant aucune cellule.

Comme à l'exemple 1, les gouttes tombent dans un bain de gélification consistant en une solution aqueuse de chlorure de calcium à environ 16 % en poids. En procédant ainsi, on immobilise les levures dans les billes de gel ainsi formées.

Dans l'étape suivante, consistant à faire diminuer le taux de calcium dans les billes, on opère également comme à l'exemple 1, si ce n'est que l'on effectue une alimentation supplémentaire d'une solution aqueuses de saccharose à 50 % à raison de 80 ml/h. De plus, les conditions opératoires sont en particulier les suivantes : le pH de la solution d'acide tartrique est compris entre 2,7 et 2,9, sa température est maintenue à 4°C.

Selon une première variante, on arrête le traitement par la solution acide dès que la teneur en calcium des billes atteint 0,1 g/kg environ, ce qui, dans les conditions opératoires précitées correspond à une durée de traitement d'environ 16 à 18 h.

Selon une deuxième variante permettant un traitement accéléré, lorsqu'il suffit, pour l'utilisation ultérieure des biocatalyseurs selon l'invention, par exemple dans le processus de prise de mousse, que la teneur en calcium dans les billes d'algi-

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

17

05 nate soit d'environ 0,30 fois la teneur maximale à saturation, soit environ 0,65 g/kg de billes humides d'alginate, on traite avec une solution aqueuse d'acide tartrique à 1 % à une température voisine à la température ambiante, par exemple environ 20°C et le traitement ne dure alors qu'environ 1 h 30 min, ce qui est suffisant pour préserver les levures. De plus, dans ce cas, on observe que l'activité levurienne n'est pas lésée, même en l'absence d'alimentation supplémentaire en solution aqueuse de saccharose.

Exemple 3

10 Utilisation du biocatalyseur de l'exemple 2 pour réaliser la "prise de mousse" du champagne

15 On utilise des billes déficientes en calcium obtenues à l'exemple 2, contenant des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et titrant 0,1 g de calcium par kilogramme de billes humides. On introduit 4 ml de ces billes humides par bouteille de 750 ml contenant du vin sucré à raison de 24 g/l de saccharose. On ferme hermétiquement les bouteilles par une capsule, on les dispose en cave horizontalement de manière à laisser se produire la fermentation dite "prise de mousse".

20 Des prélèvements effectués après 13 jours de fermentation montrent qu'il se produit une diminution de la teneur en calcium dans le vin d'environ 10 mg/l, et une diminution du taux de potassium d'environ 30 mg/l. On n'observe, par ailleurs, aucune formation de cristaux dans les échantillons prélevés.

25 Après six semaines dans cette position, les bouteilles sont mises "sur pointe", c'est-à-dire le haut en bas pour permettre aux billes, de densité supérieure à celle du vin, de descendre vers le goulot, ce qui se produit généralement en quelques secondes. On opère ensuite selon la méthode champenoise classique, c'est-à-dire
30 que l'on congèle au moyen d'une saumure le vin situé dans la partie inférieure du col de manière à emprisonner les billes dans un bouchon de glace ; celui-ci est ensuite éjecté après décapsulation de la bouteille.

35 Ainsi, grâce à l'emploi de ce biomatériau appauvri en calcium, il a été possible de stabiliser le vin vis-à-vis du calcium et/ou du potassium, tout en réalisant une fermentation

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

18

alcoolique non perturbée. On observe, par ailleurs, de manière inattendue que le vin présente après la "prise de mousse" une moindre turbidité, tandis que dans le cas des procédés connus de "prise de mousse", avec des levures incluses ou non, subsiste toujours une très légère turbidité due en partie à la présence de colloïdes d'origine levurienne.

Exemple 4

Utilisation du biomatériau selon l'invention pour régler l'activité enzymatique ou pour reconnaître, fixer ou purifier des matériaux organiques tels que des protéines ou des acides aminés

On utilise les billes de gel préparées à l'exemple 1 comme matériau de départ pour la préparation d'un biomatériau contenant un ion métallique en quantité réglée, de manière reproductible, par échange ionique classique. Cet ion métallique peut être choisi parmi le magnésium, le manganèse, le zinc, le potassium, le fer, le cuivre, le calcium, le cobalt, le molybdène, ou toute combinaison de ceux-ci.

Par exemple, on introduit une quantité réglée de cuivre en utilisant une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 3% pour réaliser l'échange ionique entre les ions cuivriques et les protons du gel.

A cet effet, on introduit 100 ml de billes humides préparées à l'exemple 1 dans 200 ml de la solution de sulfate de cuivre. Le pH du milieu, qui était de 4,5 avant l'addition des billes, chute rapidement à 2,7, puis atteint 2,3 au bout de 2 h à température ambiante.

On obtient ainsi un biomatériau à activité enzymatique réglée qui peut être utilisé dans tout procédé enzymatique comme cela est bien apparent à l'homme de l'art.

On peut également reconnaître des protéines ou des acides aminés en utilisant également du zinc comme ion métallique. Ceci permet par exemple de reconnaître l'histidine, comme cela est également bien connu à l'homme de l'art.

Une autre application de l'invention dans le domaine de l'activation enzymatique consiste en une première étape à préparer des billes de gel ionotrope immobilisant une enzyme correspondant

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

19

chacune à un cation activateur différent. Les procédés d'immobilisation d'enzymes sont bien connus de l'homme de l'art. On pourra se reporter notamment à l'ouvrage de M. MOO-YOUNG (ED.), "Bioreactor Immobilized enzymes and cells : fundamentals and applications" 05 Elsevier Appl. Sci. Publish. (New York) 1988, notamment aux articles de A. Illanes et al., et de C. Dauner-Schütze et al.

Dans une seconde étape, l'entité ionique de réticulation est au moins en partie remplacée par des protons selon le procédé de la présente invention.

10 Au moment de l'utilisation de tels biomatériaux, il suffira de substituer les protons par le cation correspondant à l'enzyme que l'on souhaite activer.

Exemple 5

15 Essais comparatifs de traitement de l'eau et du vin pour l'élimination de métaux lourds

Dans le présent exemple, on place dans une première colonne (C_1) 4 ml de billes d'alginate déficientes en entité ionique de réticulation préparées à l'exemple 1, et dans une deuxième colonne (C_2) 4 ml de billes d'alginate de calcium non 20 traitées. Une troisième colonne ne contient aucune bille, et sert de colonne témoin.

On fait passer 250 ml d'eau ou de vin au travers de chacune de ces trois colonnes, avec un débit de 85 ml/h pendant 4 h. On dose la concentration ionique avant et après traitement sur 25 colonne. Les résultats figurent aux tableaux I et II ci-dessous :

TABLEAU I

	Concentration	Eau non traitée	C_1 : billes "décalcifiées"	C_2 : billes "normales"
30	M_n	260	< 2	60
	B_a	80	< 1	< 1
	Cu	50	< 5	< 5
35	C_o	135	< 10	30

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

20

TABLEAU II

	Concentration (ppm)	Vin non traité	C ₁ : billes "décalcifiées"	C ₂ : billes "normales"
05	C _O	1,24	0,98 (-21 %)	1,12 (-10 %)
	Cu	3,10	1,96 (-37 %)	2,62 (-15,5 %)
10	F _e	3,05	2,75 (-10 %)	3,00 (-2 %)

On constate que le traitement avec les billes décalcifiées selon l'invention (C₁) conduit à une diminution importante de la concentration en métaux lourds.

15 On observera également qu'avec l'emploi de billes dites normales, c'est-à-dire non décalcifiées, on observe une diminution de la concentration en métaux lourds, due probablement un effet d'absorption de ceux-ci à la surface des billes. Cependant, les billes décalcifiées selon l'invention procurent une amélioration
20 inattendue de l'absorption des métaux lourds, qui est d'autant plus remarquable, qu'elle permet d'obtenir des concentrations extrêmement faibles en certains métaux lourds.

Il s'en suit que les gels selon l'invention peuvent être
avantageusement utilisés comme moyen pour diminuer la teneur en
25 métaux lourds de différents liquides. Notamment dans le domaine agro-alimentaire, il est particulièrement intéressant de pouvoir traiter des produits contaminés par des métaux lourds à la suite de traitements ou de la pollution de l'environnement.

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

21

REVENDEICATIONS

1. Gel ionotrope solide, en particulier sous forme de billes ou fixé sur un support approprié tel que grille ou filament, formé à partir d'un matériau gélifiable au moyen d'une entité ionique de gélification, caractérisé en ce que ledit gel est déficient en ladite entité ionique de gélification et présente des sites de fixation ionique résultant de l'absence de ladite entité ionique, lui conférant ainsi une affinité pour les ions capables de se fixer dans ledit gel sur lesdits sites de fixation inoccupés par l'entité ionique de gélification.

2. Gel ionotrope selon la revendication 1, caractérisé en ce que la teneur en entité ionique de gélification est inférieure à 0,75 fois, de préférence inférieure à 0,5 fois, et de préférence encore comprise entre 0,005 fois et 0,05 fois la teneur maximale correspondant à la saturation dans ledit gel des sites de fixation de l'entité ionique de gélification.

3. Gel ionotrope selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le matériau gélifiable précité est susceptible de s'écouler, et peut être avantageusement utilisé sous forme de gouttes que l'on gélifie en les mettant en contact avec une solution aqueuse contenant l'entité ionique de gélification précitée.

4. Gel ionotrope selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le matériau gélifiable précité est choisi parmi le groupe constitué par les sels hydrosolubles de l'acide alginique et de l'acide pectique, notamment les sels de métal alcalin, tel que sodium ou potassium, ou le sel d'ammonium, un carragénane, notamment sous forme iota et kappa, le chitosane et la carboxyméthylcellulose.

5. Gel ionotrope selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le matériau ionique gélifiable précité est un matériau gélifiable par l'ion calcium, l'entité ionique de gélification est ainsi constituée par l'ion calcium, en obtenant ainsi un gel inotrope appauvri en ion calcium, avide de cations.

6. Gel ionotrope selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué par de l'alginate de calcium dont la teneur

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

22

en ion calcium est inférieure à 1,5 mg/g de gel humide, de préférence inférieure à 1 mg/g, et de préférence encore comprise entre 0,01 mg/g et 0,1 mg/g de gel humide.

05 7. Gel ionotrope selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le matériau ionique gélifiable précité constitue un matériau d'inclusion de micro-organismes, notamment de micro-organismes de fermentation tels que les levures, ou de macromolécules telles que des enzymes, pour l'obtention d'un biocatalyseur gélifié déficient en entité ionique de réticulation, 10 avide d'ions, en particulier d'ions calcium.

8. Gel ionotrope selon la revendication 7, caractérisé en ce que le matériau d'inclusion ioniquement gélifiable est un matériau approprié compatible avec un milieu de fermentation, en particulier du domaine de l'oenologie, de préférence constitué par du 15 vin, pour la production de vin effervescent, et notamment de champagne.

9. Gel ionotrope selon la revendication 8, caractérisé en ce que le matériau d'inclusion précité est choisi parmi le groupe constitué des sels alcalins ou d'ammonium de l'acide alginique ou 20 pectique, de préférence l'alginate de sodium ou de potassium.

10. Gel ionotrope selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que la teneur en entité ionique de gélification est inférieure ou égale à environ 0,30 fois la teneur maximale correspondant à la saturation.

25 11. Procédé de préparation d'un gel solide ionotrope déficient en entité ionique de gélification, comprenant la gélification d'un matériau ioniquement gélifiable comportant des sites de fixation, ou sites de réticulation, sur lesquels se fixe ladite entité ionique, en produisant ainsi dans le gel ainsi formé la 30 saturation des sites de fixation de ladite entité ionique, caractérisé en ce qu'après gélification par ladite entité ionique de gélification, on amène la teneur en entité ionique de gélification à un niveau inférieur à celui de ladite saturation.

35 12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on amène la teneur en entité ionique de gélification à un niveau inférieur à 0,75 fois et de préférence inférieur à 0,5 fois celui

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

23

de la teneur maximale correspondant à la saturation précitée, et de préférence encore à un niveau compris entre 0,005 fois et 0,05 fois celui de ladite teneur maximale.

05 13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé
en ce qu'on réalise la diminution de la teneur en entité ionique
précitée du gel formé par gélification du matériau ioniquement
gélifiable, par échange ionique, en particulier avec des protons,
par exemple au moyen d'une solution aqueuse d'un acide que l'on
10 met en contact avec le gel précité pour que se produise un échange
ionique entre ladite entité ionique et le proton.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce
qu'on réalise la diminution de la teneur en entité ionique avec une
solution aqueuse d'un acide dont le pH est compris entre 1 et 3,5,
et de préférence compris entre 2,5 et 3,2.

15 15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé
en ce qu'on utilise un acide acceptable en alimentation, tel que
l'acide lactique.

16. Procédé selon la revendication 13, 14 ou 15, caracté-
risé en ce qu'on utilise un acide capable de former un complexe
20 avec l'entité ionique de gélification, afin d'accélérer la réduc-
tion de la teneur en entité ionique de gélification, par exemple
lorsque l'entité ionique de gélification est un ion calcium, on
utilise un diacide organique dont ladite fonction acide occupe de
préférence les positions 1 et 4, tel que l'acide tartrique.

25 17. Procédé selon l'une des revendications 11 à 16,
caractérisé en ce que le matériau ioniquement gélifiable constitue
un matériau compatible avec un milieu de fermentation, en parti-
culier du domaine de l'oenologie, de préférence constitué par du
vin, pour la production de vins effervescents, et notamment de
30 champagne.

18. Procédé selon l'une des revendications 11 à 17,
caractérisé en ce que le matériau ioniquement gélifiable constitue
un matériau d'inclusion de micro-organismes, notamment de micro-
organismes de fermentation tels que des levures, ou de macro-
35 molécules telles que des enzymes, pour l'obtention d'un bio-

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

24

catalyseur gélifié déficient en entité ionique de réticulation, avide d'ions, en particulier d'ions calcium.

19. Procédé selon l'une des revendications 11 à 18, caractérisé en ce qu'on prépare un gel à structure double couche comprenant un noyau dans lequel des cellules de micro-organismes sont incluses et une couche externe exempte desdites cellules.

20. Procédé selon l'une des revendications 18 et 19, caractérisé en ce que l'abaissement de la teneur en entité ionique de gélification est effectué à une température comprise entre 4°C et 10°C, de préférence à environ 4°C.

21. Procédé selon l'une des revendications 11 à 20, caractérisé en ce que lors de l'opération d'abaissement de la teneur en entité ionique de gélification, on réalise un apport en substrat nutritif dans le milieu contenant le gel ou le biocatalyseur, en quantité juste nécessaire pour assurer la viabilité des micro-organismes tels que les levures, inclus dans ledit gel ou biocatalyseur.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le micro-organisme précité est *Saccharomyces cerevisiae*, la quantité de substrat nutritif apportée dans ce milieu est d'environ 0,4 g de saccharose par heure pour $300 \cdot 10^9$ cellules.

23. Procédé selon l'une des revendications 18 à 22, caractérisé en ce qu'on maintient le pH de la solution acide précitée à une valeur d'au moins 2,7, lorsque le gel contient des cellules de micro-organismes tels que des levures afin de préserver l'activité desdites cellules.

24. Procédé selon l'une des revendications 17 à 23, caractérisé en ce que la teneur en entité ionique de gélification est inférieure ou égale à environ 0,30 fois la teneur maximale correspondant à la saturation.

25. Procédé selon l'une des revendications 11 à 23, caractérisé en ce que, après l'étape d'appauvrissement en entité ionique de gélification, on peut réaliser un nouvel échange ionique pour introduire un ion métallique en vue d'un emploi particulier, tel que l'activation enzymatique, ou la reconnaissance, la fixation

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

25

ou purification d'un matériau organique comme des protéines ou des acides aminés.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que cet ion métallique est de préférence choisi parmi le groupe consistant de magnésium, manganèse, zinc, potassium, fer, cuivre, calcium, cobalt et molybdène.

27. Utilisation du gel tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou tel qu'obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 26, comme matériau destiné au piégeage d'ions, en particulier de cations.

28. Utilisation du gel selon la revendication 27, en particulier sous forme de billes, dans l'industrie alimentaire, notamment dans l'industrie des jus de fruits, et en oenologie, pour prévenir ou diminuer les risques de précipitation de cristaux, tels que le bitartrate de potassium et le tartrate de calcium.

29. Utilisation selon la revendication 27 ou 28, caractérisée en ce qu'on utilise un gel ionotrope, tel que l'alginate de calcium, déficient en entité ionique de gélification, de préférence sous forme de billes, dans un procédé de prise de mousse, en particulier en bouteille selon la méthode dite "méthode champenoise", consistant en la deuxième fermentation d'un vin, tel qu'un vin de champagne, après adjonction de sucre pour l'obtention d'un vin effervescent.

30. Utilisation selon la revendication 29, caractérisée en ce que le gel contient des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces bayanus*.

31. Utilisation selon la revendication 30, caractérisée en ce que la quantité de gel d'alginate de calcium contenant des levures, de préférence sous forme de billes, introduite par bouteille de 75 cl pour le procédé de prise de mousse est généralement d'environ 4 ml pour une concentration d'environ $3 \cdot 10^8$ cellules de levure par millilitre de gel.

32. Utilisation selon l'une des revendications 29 à 31, caractérisée en ce que du gel d'alginate de calcium, non déficient en ions calcium, incluant des levures, est utilisé en adjonction avec du gel n'incorporant pas de levure, déficient en ion calcium,

WO 92/14544

PCT/FR92/00171

26

ce dernier ayant pour seule fonction de piéger les cations indésirables tels que les ions de potassium et les ions calcium.

33. Utilisation selon l'une des revendications 28 à 32, caractérisée en ce que la teneur en entité ionique de gélification est inférieure ou égale à environ 0,30 fois la teneur maximale correspondant à la saturation.

34. Utilisation du gel ionotrope selon l'une des revendications 1 à 10, en particulier sous forme de billes ou fixé sur un support approprié, tel que grille ou filament, dans des procédés d'élimination de métaux lourds tels que le plomb, le baryum, le cobalt, le fer, le manganèse et le cuivre.

35. Utilisation selon la revendication 34, caractérisée en ce que le gel est utilisé, par exemple en remplissage de colonnes, pour le traitement continu des eaux, notamment celui des effluents urbains ou industriels.

36. Utilisation du gel tel que défini à l'une des revendications 1 à 10 ou tel que préparé par le procédé selon l'une des revendications 11 à 26, dans un procédé enzymatique, en permettant ainsi de régler l'activité enzymatique, ledit gel comprenant alors une teneur déterminée en ions activateurs enzymatiques, en particulier choisi parmi le groupe consistant de magnésium, de manganèse, de zinc, de potassium, de fer, de cuivre, de calcium, de cobalt, de molybdène.

37. Utilisation du gel tel que défini à l'une des revendications 1 à 10 ou tel que préparé par le procédé selon l'une des revendications 11 à 26, dans un procédé de fixation ou de purification d'un matériau organique, en particulier de protéines ou d'acides aminés, ou dans un procédé de reconnaissance de tels protéines ou acides aminés.

38. Utilisation selon la revendication 37, caractérisée en ce que le gel ionotrope contient une quantité prédéterminée d'ions métalliques de fixation, choisis en particulier parmi le groupe consistant de magnésium, de manganèse, de zinc, de potassium, de fer, de cuivre, de calcium, de cobalt, de molybdène, permettant la fixation du matériau organique, en particulier des protéines ou des acides aminés.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00171

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ B 01 J 13/20 C 12 Q 1/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IntCl. ⁵	B 01 J C 12 Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	GB,A,2153780 (DAMON BIOTECH. INC.) 29 August 1985, see page 2, lines 5-65; page 3, lines 1-65	1,4,5,7, 9,11, 13,18, 19,25
X	GB,A,2119734 (DAMON CORP.) 23 November 1983, see page 1, lines 96-129; page 2, lines 1-23; page 5, lines 33-57	1,4,5,7, 9,11, 13,18, 19,25
A	FR,A,2633937 (COMPAGNIE MOET & CHANDON) 12 January 1990, see page 1, lines 5-10; page 3, lines 1-2; page 4, lines 13-23; page 7, lines 1-3; page 9, lines 27-36; page 10, lines 1-7 (cited in the application)	1,3,4,5, 7,8,9, 17,18, 19-28, 29,30, 31,32
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 April 1992 (14.04.92)	06 May 1992 (06.05.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9200171

SA 57689

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/04/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A- 2153780	29-08-85	US-A- 4663286	05-05-87
		AU-B- 572609	12-05-88
		AU-A- 3857285	22-08-85
		BE-A- 901704	29-05-85
		CA-A- 1238273	21-06-88
		CH-A- 665137	29-04-88
		DE-A, C 3504724	05-09-85
		FR-A, B 2559502	16-08-85
		JP-B- 1050454	30-10-89
		JP-C- 1566011	25-06-90
		JP-A- 60190229	27-09-85
		NL-A- 8500352	02-09-85
		SE-A- 8500623	14-08-85
GB-A- 2119734	23-11-83	US-A- 4352883	05-10-82
		BE-A- 882476	29-09-80
		CA-A- 1145258	26-04-83
		CH-A- 657786	30-09-86
		CH-A- 653914	31-01-86
		DE-A, C 3012233	20-11-80
		FR-A, B 2452285	24-10-80
		FR-A, B 2457688	26-12-80
		GB-A, B 2046209	12-11-80
		GB-A, B 2119737	23-11-83
		JP-C- 1602245	26-03-91
		JP-A- 55157502	08-12-80
		JP-B- 62039131	21-08-87
		JP-C- 1437093	25-04-88
		JP-A- 61293919	24-12-86
		JP-B- 62042889	10-09-87
		SE-B- 448060	19-01-87
		SE-A- 8002357	29-09-80
		US-A- 4391909	05-07-83
FR-A- 2633937	12-01-90	AU-A- 3961289	05-02-90
		EP-A, B 0350374	10-01-90
		WO-A- 9000602	25-01-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00171

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

Int.C1.5 B 01 J 13/20 C 12 Q 1/02

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

A Documentation minimale consultée ⁸	
Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	B 01 J C 12 Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

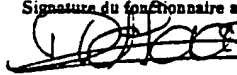
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	GB,A,2153780 (DAMON BIOTECH. INC.) 29 août 1985, voir page 2, lignes 5-65; page 3, lignes 1-65 ---	1,4,5,7 ,9,11, 13,18, 19,25
X	GB,A,2119734 (DAMON CORP.) 23 novembre 1983, voir page 1, lignes 96-129; page 2, lignes 1-23; page 5, lignes 33-57 ---	1,4,5,7 ,9,11, 13,18, 19,25
A	FR,A,2633937 (COMPAGNIE MOET & CHANDON) 12 janvier 1990, voir page 1, lignes 5-10; page 3, lignes 1-2; page 4, lignes 13-23; page 7, lignes 1-3; page 9, lignes 27-36; page 10, lignes 1-7 (citée dans la demande) -----	1,3,4,5 ,7,8,9, 17,18, 19,28, 29,30, 31,32

^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 14-04-1992	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 6. 05. 92
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  Danielle van der Haas

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200171

SA 57689

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/04/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A- 2153780	29-08-85	US-A- 4663286	05-05-87
		AU-B- 572609	12-05-88
		AU-A- 3857285	22-08-85
		BE-A- 901704	29-05-85
		CA-A- 1238273	21-06-88
		CH-A- 665137	29-04-88
		DE-A, C 3504724	05-09-85
		FR-A, B 2559502	16-08-85
		JP-B- 1050454	30-10-89
		JP-C- 1566011	25-06-90
		JP-A- 60190229	27-09-85
		NL-A- 8500352	02-09-85
		SE-A- 8500623	14-08-85
GB-A- 2119734	23-11-83	US-A- 4352883	05-10-82
		BE-A- 882476	29-09-80
		CA-A- 1145258	26-04-83
		CH-A- 657786	30-09-86
		CH-A- 653914	31-01-86
		DE-A, C 3012233	20-11-80
		FR-A, B 2452285	24-10-80
		FR-A, B 2457688	26-12-80
		GB-A, B 2046209	12-11-80
		GB-A, B 2119737	23-11-83
		JP-C- 1602245	26-03-91
		JP-A- 55157502	08-12-80
		JP-B- 62039131	21-08-87
		JP-C- 1437093	25-04-88
		JP-A- 61293919	24-12-86
		JP-B- 62042889	10-09-87
		SE-B- 448060	19-01-87
		SE-A- 8002357	29-09-80
		US-A- 4391909	05-07-83
FR-A- 2633937	12-01-90	AU-A- 3961289	05-02-90
		EP-A, B 0350374	10-01-90
		WO-A- 9000602	25-01-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.